

令和元年6月25日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07683

研究課題名(和文) 納豆菌挿入配列の制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of insertion sequences found in the genome of *Bacillus subtilis* (natto)

研究代表者

木村 啓太郎 (KIMURA, Keitarou)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・ユニット長

研究者番号：20353980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：挿入配列(以下、ISとする)は転移酵素遺伝子とその両端の繰り返し配列で構成される“動く遺伝子”である。ISはゲノム中を転移し、転移先遺伝子の破壊や断片化を引き起こすことによってゲノムの構造的進化に影響を与えたと考えられる。本研究は、納豆菌で見つかった複数のISの制御機構解明を目的として行った。

本研究で得られた最も興味深い結果は、ヘリカーゼドメインを持つ遺伝子(BSNT\_10618)の破壊によりISの転移頻度が高くなったことである。つまり、BSNT\_10618がIS転移を抑制する機能を持つことが示唆された。連携研究先と協力しながら研究を継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

挿入配列(以下、IS)の発現制御に関する先行研究として、大腸菌で見つかったIS転移促進タンパク質Ieeが挙げられる。本研究では、Ieeと部分的な類似性を持つ納豆菌BSNT\_10618が、むしろ転移を抑制する機能を持つことが明らかになった。納豆菌のように非常に多種多コピーのISを有する株が転移を抑制する仕組みを持つ可能性が強く示唆されたことに学術的意義がある。また、RNS-seq解析(DNA配列解析装置による網羅的な遺伝子発現解析)を通じて、東京農大が開発したIS転移頻度測定法(Jumping CAT法)の再現性と妥当性が確認できたことは科学的に意義深く、継続的な研究深化に繋がる成果である。

研究成果の概要(英文)：Insertion sequence (IS) is a mobile genetic element consist of a transposase gene and an inverted repeat sequence. ISs translocate in the genome and can disrupt gene (s), thus have committed on structural evolution of genome. This study started to elucidate regulatory mechanism of ISs found in the genome of *Bacillus subtilis* (natto).

One of the most important findings obtained in this study is suppressive function of the gene BSNT\_10618. Disruption of BSNT\_10618 greatly increased the frequency of transposition of the insertion sequence which suggested that *Bacillus subtilis* (natto) can harbor many copies of IS by suppressing the translocation of IS with the BSNT\_10618.

研究分野：応用微生物学

キーワード：挿入配列 ゲノム進化 納豆菌 転移 遺伝子破壊 insertion sequence transposition IS256Bsu1

## 1. 研究開始当初の背景

挿入配列 (Insertion sequence, IS) は転移酵素 (transposase) 遺伝子とその両端の繰り返し配列で構成される“動く遺伝子”である。近年多くの細菌ゲノムが解読され、IS として報告された遺伝子総数は 4000 を超えた<sup>1</sup> (Siguier, et. al. *FEMS Microbiol. Reviews*, 2014)。IS は転移酵素 transposase のアミノ酸配列相同性から現在 26 グループに分類されている。ゲノム中で転移し自身のコピー数を増やす性質を持つため、IS はゲノムに積極的な変異を引き起こしていると言える。IS の切り出し/再挿入に伴ってゲノムの一部が欠失する事例もあり、IS によるゲノム多様性創出への関心が高まっている。transposase が DNA 断片の切り出し/再挿入の両反応を触媒することが注目されたため、これまでの IS 研究では転移反応を酵素の高次構造と機能相関から論じる試みが多い<sup>1</sup> (Siguier, et. al. *FEMS Microbiol. Reviews*, 2014)。一方、過剰な IS 発現は致死性となる可能性が高いことから IS 自身の発現には何らかの抑制的制御が働いていると考えられる。しかし、IS 自身の発現制御に関する研究は後述するように非常に限られている。

*Bacillus subtilis* は分子生物学的研究を進めるための各種ツールが整備されているモデル細菌の一つである。*B. subtilis* の IS として初めて報告されたのは納豆菌、*Bacillus subtilis* (natto)、由来 IS4*Bsu1* である<sup>2</sup> (Nagai, et.al. *J. Bacteriol.* 2000)。IS4*Bsu1* は、納豆の粘り物質 (poly- $\gamma$ -glutamic acid, 以下  $\gamma$ PGA) 生産を制御する 2 成分制御系遺伝子 *comP-comA* に転移し易い性質を持つ。これが業界で問題となっていた“粘らない納豆菌”出現の原因だったのである (Nagai, et.al. *J. Bacteriol.* 2000)。近年公開された納豆菌ゲノム情報により、納豆菌が 5 グループ計 37 コピーの IS 遺伝子を有することが明らかになった<sup>3</sup> (Nishito, et. al. *BMC genomics* 2010)。この内実際に転移した事例が確認されたものは IS4*Bsu1* の他に IS256*Bsu1* があるだけで<sup>4</sup> (Kimura and Itoh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007)、残りの IS については塩基配列以上の情報は得られていない。

IS 自身の発現制御に関する研究例として、東農大グループの IS4*Bsu1* に関する研究と大腸菌で見つかった IS 転移を促すタンパク質因子 Iee(insertion sequence excision enhancer)に関する研究を挙げることができる。東農大グループは IS4*Bsu1* 発現をモニターできる実験系を構築し、その発現がコンピテンス誘導条件下で高くなることを報告した (Takahashi, et al. *Microbiology*, 2007)。IS が“利己的遺伝子”だとすれば、宿主の生存が脅かされる状況 (栄養飢餓や薬剤投与、UV 照射など) で IS 転移が誘発される可能性があるが、こうした生理的条件と発現誘導に関する詳細な検討はこれまで行われていない。また、IS を全く持たない菌株がある一方で非常に多種多コピーの IS を有する株が存在することは、細菌が IS 転移を抑制する (あるいは刺激する) 仕組みを持っている可能性を強く示唆する。Kusumoto らの研究によれば、大腸菌 Iee は IS ファミリー選択性 (IS3>IS1>IS30>>IS4>>その他の IS ファミリー) を持ち、IS629 のゲノムからの切り出し効率を 10<sup>7</sup> 倍に高めることができる<sup>5</sup> (Kusumoto, et al. *Nature Communications*, 2011)。大腸菌 Iee は、IS629 による腸管出血性大腸菌 (EHEC) 毒素遺伝子 *stx2* の不活性化にも関与しており注目されている<sup>5</sup> (Kusumoto, et al. *Nature Communications*, 2011)。

## 2. 研究の目的

挿入配列 (Insertion Sequence, IS) は転移酵素 (transposase) 遺伝子とその両端の繰り返し配列で構成される。IS は転移酵素の働きによってゲノム中を転移し、転移先遺伝子の破壊や断片化などの変異を引き起こすことによってゲノムの構造的進化に重要な影響を与えたと考えられる。IS は転移先近傍の遺伝子発現に影響することもある。しかし、IS 自身の発現制御や転移先嗜好性についての知見は十分とは言えない。本研究では、*Bacillus subtilis* で見つかった IS4*Bsu1*、IS256*Bsu1* 他計 5 グループ 37 コピーの IS について、転移誘発条件と転移先嗜好性、更に、ゲノムからの IS 切り出しを制御する因子 (IS excision enhancer, iee) の解析を進め、IS による細菌ゲノム多様性獲得メカニズムとその制御機構解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 納豆菌 IS 群の網羅的な発現解析

ゲノム解析によって同定された 5 グループ (IS4*Bsu1*, IS256*Bsu1*, IS643-like, IS*Bma2*-like, IS*Lmo1*-like) 計 37 コピー

の IS に関する基礎情報を得るため、細胞内全 RNA を対象とした次世代 DNA シーケンサーを用いた転写解析 (RNA-seq 解析) を行った。また、IS*4Bsu1* の転写がコンピテンズ誘導条件下で活発になるとの報告があるので、コンピテンズが高い納豆菌変異株<sup>6</sup> (Do et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011) も解析に加えた。納豆菌を最少培地 E9 で定常期まで培養し全 RNA を市販のキット (Trizol reagent, life technology) を用いて調製し、RNA-seq 解析は受託解析機関 (Filgen 社) に依頼した。

#### (2) IS 転移の定量的な分析

hop-on アッセイ法<sup>7</sup> (Takahashi et al., 2007) および Jumping-cat 法<sup>8,9</sup> (Takahashi et al., 2007, Akashi et al., 2014) で IS 転移の定量的な分析を行った。hop-on アッセイでは 2 つのプラスミド pQP1 および pQG1 を用いた。いずれも IS*4Bsu1* の両末端繰り返し配列の間に発現調節領域を有しない (プロモーター無) レポーター遺伝子 (pQP1 は LacZ, pQG1 は GFP) を連結したもので、転移先でそれらが発現した場合に LacZ 酵素活性や GFP 蛍光を発現する仕組みである。Jumping CAT 法では、同様に IS*256Bsu1* の両末端繰り返し配列を持つクロラムフェニコール耐性遺伝子 (cat) を *amyE* 遺伝子座に予め導入し、cat 遺伝子のゲノム内転移によりクロラムフェニコール耐性となることを指標にして転移頻度を測定した。これらの実験に必要なプラスミドは東農大、吉川教授より分与いただいた。

その他の分子生物学の実験は定法に従って行った。DNA 配列はキャピラリー DNA シーケンサー (ABI310) と市販のキット (BigDye v.3.1) を用いて決定した。GFP 蛍光をフローサイトメーター (Sony CE800) で測定した。

#### (3) Iee ホモログ遺伝子の機能解析

納豆菌ゲノムには Iee に似たタンパク質をコードする遺伝子 (Iee ホモログ遺伝子, locus tag=BSNT\_10618) がある。この遺伝子の機能解析は行われていない。大腸菌 Iee と納豆菌 Iee ホモログ間のアミノ酸配列相同性は約 55% であり、納豆菌 Iee ホモログには C 末端側に相同性のない領域 (アミノ酸約 300 残基) が付加されている。定法に従って納豆菌 Iee ホモログ遺伝子破壊株を構築し、Jumping-cat 法により IS 転移頻度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 挿入配列 (IS*4Bsu1*, IS*256Bsu1*, IS*643-like*, IS*Bma2-like*, IS*Lmo1-like*) の発現量

コピー数の大きい納豆菌 IS 遺伝子群の制御機構を研究する上で、RNA-seq 法による網羅的な転写物解析は一度に全 IS の転写量を比較できるので非常に有効な手法である。最少培地で培養した野生株納豆菌から納豆菌全 RNA を抽出し受託解析機関で分析した。各 IS の発現量 (RPMK 値) の平均値は、IS*4Bsu1* が 1.2、IS*256Bsu1* が 51.2、IS*643-like* が 0.5、IS*Bma2-like* は 0 (検出されず)、IS*Lmo1-like* は 0.2 であった。IS*4Bsu1* と IS*256Bsu1* が転移能を有する主要な IS であることが裏付けられた。しかし、使用した培養条件下で IS*4Bsu1* が転移することわかっている<sup>2</sup> (Nagai et al., 2000)、IS*643-like* の 0.5、および IS*Lmo1-like* の 0.2 は無視できる RPMK 値ではない。今後これらが転写されていることを qPCR 法などで確認する必要がある。IS*Bma2-like* の転写産物は検出されなかった。恐らく偽遺伝子であると思われる。

我々が過去に納豆菌細胞内でのプラスミドへの IS 転移実験を行った時には、転移した IS の 85% が IS*4Bsu1*、15% が IS*256Bsu1* であった<sup>4</sup> (Kimura and Itoh, 2007)。今回得られた RNA-seq データでは、IS*256Bsu1* の転写レベルは IS*4Bsu1* よりも約 40 倍高かった。実験に使用したプラスミドは約 7 kbp であり、転移の DNA 配列依存性が低いことを考えれば、IS 転移に転写後調節が関与することを示唆する興味深い結果であった。一方、IS を全く保有しない枯草菌実験室株 (*B. subtilis* 168) でも、IS*256Bsu1* の発現量が他よりも顕著に高い報告があり (Akashi et al., personal communication)、少なくとも転写段階では IS は両株でよく似た挙動を示すことが本研究で初めて明らかとなった。

#### (2) IS 転移の定量的測定

##### ・hop-on アッセイ法

納豆菌に pQP1 および pQG1 を導入したところ、LacZ 活性染色法ではコロニーが部分的に青く染色された (図 1)。しかし、通常の方法 (Miller 法) では LacZ 活性は測定できなかった。また、フローサイトメーター (Sony CE800) で、分析細胞数を 100 万個まで増やしても GFP 蛍光を有する細胞は検出できなかった。

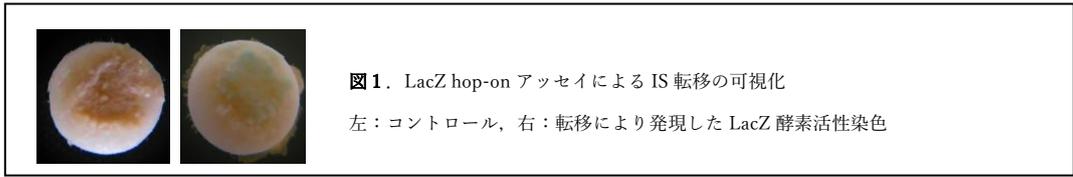


図1. LacZ hop-on アッセイによる IS 転移の可視化  
左：コントロール，右：転移により発現した LacZ 酵素活性染色

・ Jumping-CAT 法

新しい IS 転移検出法として 2017 年 3 月に Jumping CAT 法が発表された<sup>9</sup> (Akashi et al., 2017). レポーター遺伝子にクロラムフェニコール耐性遺伝子が使用されているため検出感度が高い (次項参照).

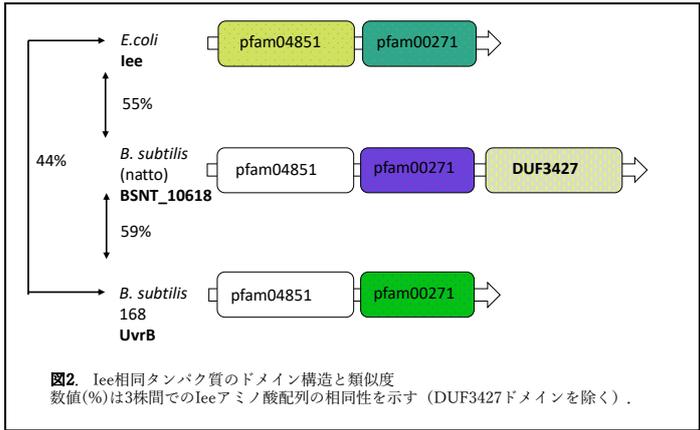


図2. Iee相同タンパク質のドメイン構造と類似度  
数値(%)は3株間でのIeeアミノ酸配列の相同性を示す (DUF3427ドメインを除く)。

(3) Iee ホモログの働き

大腸菌で見つかった IS 転移を促すタンパク質因子 Iee(insertion sequence excision enhancer) の納豆菌ホモログに関する研究を進めるため、納豆菌 Iee ホモログ遺伝子 (locus tag, BSNT\_10618) の破壊株を作成した。Jumping CAT 法で IS 転移頻度を測定したところ、予想に反して、むしろ転移頻度は大幅に上昇した。

納豆菌 Iee ホモログ遺伝子(locus tag, BSNT\_10618) の破壊株で観察された転

移頻度は  $6.0 \pm 2.9 \times 10^{-7}$  (クロラムフェニコール耐性細胞数/総細胞数) であった (野生型では  $< 10^{-9}$ )。cat 遺伝子が転移先で発現するためには、ゲノム内の構成的に転写される部位に正しい向きで挿入される必要がある。ゆえに、実際の転移頻度は Jumping CAT 法で測定された転移頻度と比べて高いと考えられた。相同性は低いものの BSNT\_10618 遺伝子は *uvrB* 遺伝子ともアミノ酸配列が似ている。ただし、BSNT\_10618 遺伝子の C 末側には *uvrB* には存在しないドメインがある (図 2)。 *uvrB* 遺伝子破壊株は UV 感受性が高くなることが報告されている。BSNT\_10618 破壊株の UV 感受性を調べたが、野生株と比較して UV 感受性に有意な差は認められなかった。大腸菌 Iee および UvrB はエキソヌクレアーゼ活性を有し、それぞれ IS のゲノムからの切り出し、UV 損傷した DNA の修復を担う。BSNT\_10618 遺伝子破壊株の IS 転移頻度が高くなったことは、BSNT\_10618 が Iee や UvrB と同様に特定の DNA 配列を認識して結合する能力を持ち、IS のゲノムからの切り出しを抑制している可能性が示唆された。

(4) IS 転移の確認

Jumping CAT 法でクロラムフェニコール耐性を示した株を無作為に 8 株選び、ゲノム DNA を用いてサザンハイブリダイゼーション解析を行った (プローブは cat 遺伝子) (図 3)。クロラムフェニコール耐性では、予め *amyE* 遺伝子座に導入した cat 遺伝子他に 1 ~ 2 個の転移した cat 遺伝子が検出された (図 3 左)。興味深いことに、8 株中 4 株では cat 遺伝子は自身の直ぐ隣に連結して転移していた。また、8 株中 1 株は納豆の粘性物質であるポリ -  $\gamma$  - グルタミン酸 ( $\gamma$  PGA)

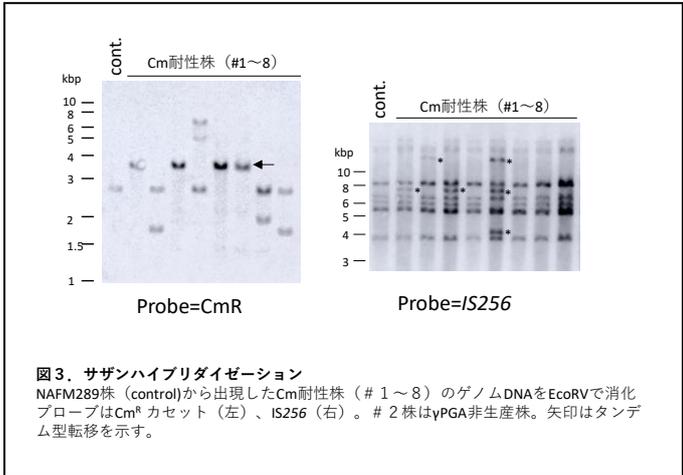


図3. サザンハイブリダイゼーション  
NAFM289株 (control) から出現したCm耐性株 (# 1~8) のゲノムDNAをEcoRVで消化  
プローブはCm<sup>r</sup> カセット (左)、IS256 (右)。# 2 株は $\gamma$ PGA非生産株。矢印はタンデ  
ム型転移を示す。

の生産能が失われていた。この株の *cat* 遺伝子転移先を調べたところ、細胞密度による遺伝子発現制御系（クオラムセンシング）において密度指標となる菌体外クオラムシグナルの受容体をコードする *comP* 遺伝子の 630 番目塩基に *cat* 遺伝子が挿入されていた（図4）。この結果は *comP* が IS 転移のホットスポットであることを示唆した過去の研究<sup>2</sup> (Nagai et al., 2000) と矛盾しなかった。加えて、クロラムフェニコール耐性株の中に *IS256Bsu1* のコピー数が増えていた株が容易に見つかることから（図3右）、Jumping CAT 法が納豆菌 IS の評価法として妥当であることを示した。

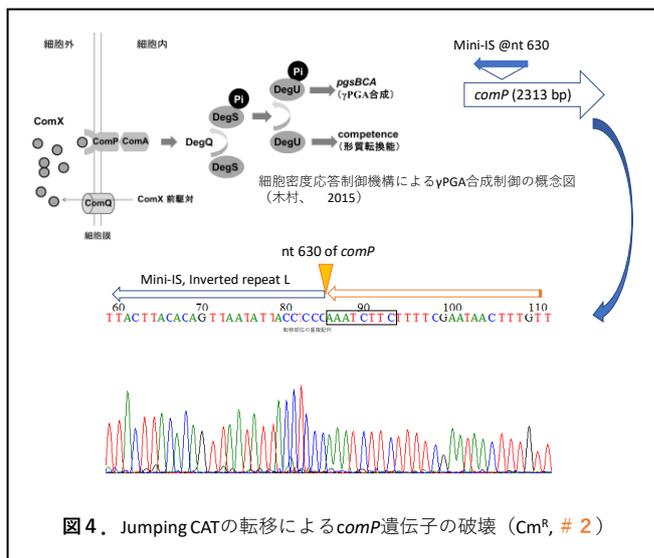


図4. Jumping CATの転移による *comP* 遺伝子の破壊 (Cm<sup>R</sup>, # 2)

#### (5) IS の転移条件の検討

IS 転移の誘発条件として、これまで細胞がコンピテントな状態（外部から DNA を積極的に細胞内に取り込む状態）で *IS4Bsu1* の転移が活発になることが報告されている<sup>8</sup> (Takahashi2007)。そこで、納豆菌の高コンピテント変異株 (NAFM73)<sup>6</sup> (Do 2011) から全 RNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した（表1）。その結果、高コンピテント変異株では *IS4Bsu1* と *IS643-like* の転写量が有意に増加しており、特に *IS4Bsu1* でその傾向が強く既報を支持するデータが得られた。一方、*IS256Bsu1* の転写量に有意差はなかったため、IS 毎に誘導条件が異なることが示唆された。また、UV 照射による転移誘発を Jumping CAT 法で検

討したが、転移頻度は UV 照射の影響を受けなかった（照射条件：UV 殺菌灯，生存率約 1 0 %）。

表1. 納豆菌 IS 群の転写量解析 (RNA-Seq)

	相対的転写量 (RPMK 値)			
	<i>IS643-like</i>	<i>ISLmo1-like</i>	<i>IS256Bsu1</i>	<i>IS4Bsu1</i>
野生型 (NAFM5)	0.51 ± 0.51	0.22 ± 0.7	51 ± 47	1.2 ± 0.82
高コンピテンス変異株 (NAFM73)	6.8 ± 3.3	1.3 ± 2.1	32 ± 26	39 ± 12

#### (6) 今後の課題

IS を全く持たない実験室株 (*Bacillus subtilis* 168) には BSNT\_10618 遺伝子が存在しない。つまり、BSNT\_10618 の前後のゲノム構造は納豆菌、枯草菌実験室の両者間で保存されているものの、BSNT\_10618 は納豆菌だけに存在する。納豆菌の BSNT\_10618 は隣の *uvrB* 遺伝子を元に遺伝子重複によって獲得された可能性が考えられ、IS の多重コピー化との関連性に興味を持たれるところである。実験室株に BSNT\_10618 を導入し、Jumping CAT 法を用いて転移頻度を与える影響を評価すれば、BSNT\_10618 の転移抑制機能が直接証明されるだけでなく、様々な実験系の整った実験室株をホストとすることによって研究が加速されると期待できる。

#### <引用文献>

- ① Siguier, P., Gourbeyre, E. & Chandler, M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 865–891 (2014).
- ② Nagai, T., Tran, L. S., Inatsu, Y. & Itoh, Y. A new IS4 family insertion sequence, *IS4Bsu1*, responsible for genetic

- instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 2387–2392 (2000).
- ③ Nishito, Y. *et al.* Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. *BMC Genomics* **11**, 243 (2010).
  - ④ Kimura, K. & Itoh, Y. Determination and Characterization of IS *4Bsu I*-Insertion Loci and Identification of a New Insertion Sequence Element of the IS *256* Family in a Natto Starter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2458–2464 (2007).
  - ⑤ Kusumoto, M. *et al.* Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.* **2**, 152 (2011).
  - ⑥ Do, T.-H. *et al.* Mutations Suppressing the Loss of DegQ Function in *Bacillus subtilis* (natto) Poly- $\gamma$ -Glutamate Synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8249–8258 (2011).
  - ⑦ Takahashi, K., Chibazakura, T., Sekine, Y. & Yoshikawa, H. Development of a new “GFP hop-on assay” system for insertion sequence transposition in *Bacillus subtilis* 168 using IS*4BsuI* from *B. subtilis* (natto). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 426–430 (2007).
  - ⑧ Takahashi, K., Sekine, Y., Chibazakura, T. & Yoshikawa, H. Development of an intermolecular transposition assay system in *Bacillus subtilis* 168 using IS*4BsuI* from *Bacillus subtilis* (natto). *Microbiology* **153**, 2553–2559 (2007).
  - ⑨ Akashi, M. *et al.* Transposition of insertion sequence IS*256BsuI* in *Bacillus subtilis* 168 is strictly dependent on *recA*. *Genes Genet. Syst.* **92**, 59–71 (2017).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① **Keitarou Kimura** and Satoshi Yokoyama, Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. (2019) *Current Opinion in Biotechnology*, doi 10.1016/j.copbio. 2018.09.001. 査読あり
- ② **Keitarou Kimura**, Takashi Inaoka, and Kazutaka Yamamoto, Metabolome analysis of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated with high hydrostatic pressure at 400 and 600 MPa. (2018) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, doi 10.1016/j.jbiosc.2018.05.007. 査読あり
- ③ Nguyen Se Le Thanh, Takashi Inaoka, and **Keitaou Kimura**, Poly-gamma-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* (natto) under high salt conditions. (2018) *Japan Agroiculture Research Quarterly: JARQ*, doi 10.6090/jarq.52.249. 査読あり
- ④ Yuji Kubo, Sriyam Supawadee, Rikio Nakagawa, and **Keitarou Kimura**, A survey of phage contamination in Natto-fermenting factories and development of phage resistant *Bacillus subtilis* (natto) strains. (2018) *Food Science and Technology Research*, doi 10.3136/fstr.24.485. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 木村啓太郎, 片野亘, 浅井計, 吉川博文, Jumping CAT 法による納豆菌細胞内での IS 転移検出と転移制御因子の解析, グラム陽性菌ゲノム機能会議 講演要旨集, P-32, 2018 年 8 月, 熱海

〔図書〕(計 1 件)

- ① 木村啓太郎, 高部晴市, 農山漁村文化協会, なっとう菌, 2018 年, 32

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/nfri/introduction/chart/0602/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 吉川 博文

ローマ字氏名: YOSHIKAWA, Hirofumi